

A GRAVIRECEPCIÓ-LOKOMÓCIÓ reflexív neuronális konnektivitásainak azonosítása során a nagy mocsári csigában (*Lymnaea stagnalis*) **a vestibuláris rendszer perifériás érzékszervében, a statocystában** i) intra- és extracelluláris jelölést (neurobiotin, Lucifer yellow és HRP) követően jellemeztük a mechanoreceptorok (szőrsejtek) efferens (központi) projekcióit; ii) immunhisztokémiai úton elemeztük a szenzoros neuronok lehetséges transzmitter tartalmát; iii) vizsgáltuk az érzősejtek ultrastruktúráját és HRP-jelölést követően centrális kapcsolatait. Új módszert dolgoztunk ki, mellyel HRP és a membrán permeabilitást fokozó Streptolysin O a statocysta üregbe történő együttes injektálását követően az érzősejtek nagyobb populációja volt megjelölhető. Kimutattuk, hogy az egyes érzősejtek illetve érzősejt populációk axon projekciói az ipsilaterális cerebrális ganglion neuropiljében egy kisebb területen, zártan arborizálnak, miközben ellenoldali projekciókat is létesítenek. Az ipsilaterális arborizáció további anatómiai jellemzése során a HRP-vel jelölt elemek korrelatív fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatával kimutattuk, hogy csak kevés jelölt profil létesít interneuronális kapcsolatot, melyeknek két formája volt elkülöníthető i) jelölt végződés axo-szomatikus kapcsolatai jelöletlen érzősejtekkel, ii) jelölt végződés axo-axonikus kapcsolatai jelöletlen posztszinaptikus profilokkal. A statocysta efferens axonjai szoros, de nem specializált axo-axonikus kapcsolatokat mutatnak a statocysta idegben. Mindezek alapján az érző bemenetek illetve kimenetek nagyfokú, szinaptikus verzatilitása tételezhető fel, mely egyben a szenzoros információ módosításának illetve a szenzoros információ módosító szerepének jeleként értelmezhető. TEM vizsgálatok szerint az érzősejtek ultrastruktúrája jellegzetes, kettős intracelluláris szerveződést mutat: a citoplazma legnagyobb, elektron transzparenssebb része csak nagyszámú agranuláris vagy granuláris elemet tartalmaz, míg a sejtek szubcelluláris alkotóelemeit tartalmazó perinukleáris és perifériás területei magas elektron denzitásúak. Az érzősejtek vezikula- és granulum tartalma azok kevert neurokémiai karakterét veti fel. Immunhisztokémiai úton 7-8 hisztamin, 3 glutamát és 1 FMRFamid immunreaktív (IR), továbbá NADPH-d hisztokémia segítségével 2-3 reaktív érzősejtet lehetett kimutatni; a neurokémiaiilag identifikált szőrsejtek pontos anatómiai/térbeli lokalizációját is megállapítottuk.

A *Lymnaea* statocysta celluláris szerveződését és ultrastruktúráját a fejlődés embrionális életszakaszában is vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy posztmetamorfotikus E75% és E90% embriókban i) a gravireceptor szőrsejtek ultrastruktúrája már a kifejlett, szabadon mozgó állathoz hasonló; ii) a statocysta belső terében ugyanakkor csak néhány nagyméretű statolith van jelen, mely arra utal, hogy embrionális korban az érzőfunkciót a gravirecepció eltérő („súlytalanabb”) feltételeihez „alkalmazkodó” közvetítőstruktúra biztosítja.

Az **AMINERG RENDSZEREK** elemzése során **a nagy mocsári csiga, *Lymnaea stagnalis*, embriógenézisének és embrionális magatartásformáinak aminerg szabályozását vizsgálva** kimutattuk, hogy mind a DA, mind az 5-HT mennyisége a késői embriógenézis során erőteljesen (2-300%) emelkedik, mely jól korrelál a szintetizáló rendszerek enzimaktivitásának alakulásával. Kimutattuk, hogy a monoamin szintek bármilyen (pozitív vagy negatív) irányú változása egyaránt az embriógenézis lassulását váltja ki: korai (E40%) embriókban (veligera lárvák) a különböző monoamin szintézis gátlók (MPTP, MPP-jodid), az aromás aminosav dekarboxiláz gátló Nsd-1015 és a triptofán hidroxiláz gátló pCPA 25-40%-kal, míg a szintézis szubsztrátok (L-triptofán, tirozin) 18-55%-kal megnyújtották az embriógenézis időtartamát. pCPA (0.1 mM), illetve Nsd-1015 (0.1 mM) kezeléseket követően 5-HT immunreaktív neuronok az E70%-E95%-os fejlettségű embriókban nem voltak megfigyelhetők. Széleskörű farmakológiai és azokhoz kapcsolódó fiziológiai vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az embrionális forgómozgást, illetve a reszelőnyelv (radula) mozgást (=táplálkozási aktivitás) mindkét monoamin serkentette, míg a posztembrionálisan megjelenő felnőttzerű csúszómozgásra csak az 5-HT hatott serkentőleg. Kimutattuk az 5-HT receptor

agonistáinak és antagonistáinak a forgómozgást serkentő, illetve gátló hatását, embrióból készített membrán preparátumban a ^3H -5HT kötődés egyetlen nagy affinitású kötőhelyét, a forgómozgást hatásosan gátló specifikus farmakonok ^3H -5HT kötődését gátló hatását, továbbá hogy az 5-HT receptor az embriókban negatívan kapcsolt az adenil-cikláz rendszerrel. Eredményeink alapján megállapítható, hogy az embrionális forgómozgást szabályozó 5-HT receptor azonos a gerincesekben azonosított 5HT_{1A} receptorral.

A táplálkozási rendszer 5-HTerg innervációjának neuroanatómiai jellemzőit nagy mocsári csigában (*Lymnaea stagnalis*) vizsgálva megállapítottuk, hogy az 5-HT-IR rostok a pofaizomzat efferenciációs elemeit tartalmazó pofaganglionban jellegzetes kosaras elrendeződésben axo-szomatikus kapcsolatokat létesítenek, míg a pofaizomzatot poliszinaptikus elrendeződésben innerválják. A pofaizomzat első 5-HT-IR elemei E70%-os embriókban jelennek meg, melyet a késői embriogenezis (E28-100%) és a korai (P1-2) juvenilis korban a pofaizomzat és az 5-HT-IR innerváció párhuzamos, graduális maturációja jellemez. Nagyfelbontású konfokális mikroszkópia segítségével pontosítottuk a fejlődő (embrionális és juvenilis) állat pofaizomzatának 5-HT immunreaktív innervációs képét. Késői embrionális pofaizomzatban nem-specializált ideg-izom kapcsolatokat azonosítottunk ultrastrukturális szinten. A P1-P6 juvenilis stádiumokban meghatároztuk a pofaizomzatban az 5-HT koncentráció viszonyait, mely fokozatos emelkedést mutat (P1 - 3,6 pmol/mg, P6 - 6,0 pmol/mg, felnőtt - 12,4 pmol/mg), továbbá egy egykomponensű, Na^+ függő 5-HT felvételi mechanizmust ($K_m=13,65 \mu\text{M}$, $V_{\max}=12,7 \text{ pmol/mg/20 perc}$) és a hozzá kapcsolódó $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ függő 5-HT uptake-release rendszert mutattunk ki és azokat farmakológiaiailag jellemeztük. Kimutattuk, hogy a pofaizomzatból készült membrán preparátum nagy affinitással ($K_d=4,5 \text{ nM}$, $B_{\max}=2,4 \text{ fmol/mg}$) köti a ^3H -5HT-t és a receptor pozitívan kapcsolt az adenil cikláz második hírvivő rendszerhez. Farmakológiai vizsgálataink szerint a pofaizomzatban a neuromuszkuláris 5-HTerg folyamatok 5-HT_6 típusú receptorhoz kapcsolódnak.

Monoaminok szerepét *Helix pomatia* (izom)aktivitásának szabályozásában vizsgálva főbb eredményeink a következők. i) a cAMP koncentráció növekedését detektáltuk *in vivo* 5-HT injektálást követően a szív- (38%) és talpizomban (89%). Szívizomból készített membrán preparátumon az 5-HT serkentő hatása 3-400%-os volt. ii) Kimutattuk, hogy a két izomban az 5-HT által stimulált cAMP különbözik az idegrendszerben jelenlévőtől. iii) Kimutattuk, hogy a cAMP függő protein kináz aktivitásának serkentése révén a talpizom relaxációjában részt vevő fehérje mennyiség növelhető, továbbá, hogy a talpizomzatban azonosított 250 kDa-nál nagyobb fehérje molekulát jelző radioaktív foszfor mennyisége cAMP illetve 5-HT hatására jelentős mértékben emelkedett. Az amit A cAMP szint 5-HT hatására történő koncentrációfüggő növekedése adenilát- ciklázhoz kapcsolt 5-HT receptor jelenlétét bizonyította. iv) Igazoltuk (PAGE-SDS gél elválasztás – blottolás - anti-dekarboxiláz immunfestés útján), hogy az 5-HT - cAMP - PKA - foszforilált protein metabolikus út során képződő 50 kDa súlyú protein mind a szívben, mind a talpizomban az 5-HT szintézisében részt vevő aromás aminosav-dekarboxiláz. v) Indirekt (forskolin illetve SCP_B kezelés) és direkt (PKA, piridoxal-5'-foszfát, 5-HT szubsztrát kezelés) úton is bizonyítottuk, hogy a PKA aktivitás (foszforiláció) a szívben dekarboxiláz expressziót eredményez. vi) A talpizomban jelenlévő 5-HT receptorról kimutattuk, hogy α) az 5-HT-receptor pozitívan kapcsolt az adenil-cikláz rendszerhez; az 5-HT serkenti a cikláz aktivitását; β) a periférián (talpizom) illetve a CNS-ben jelenlévő adenil-ciklázhoz kapcsolt 5-HT-receptor eltérő farmakológiai tulajdonságokat mutat; μ) a ^3H -5HT kötődés farmakológiai vizsgálata révén a talpizomban az 5-HT_6 típusú receptor jelenlétét.

A GLUTAMÁTERG RENDSZER immunhisztokémiai, biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatával elsőként adtuk a szignál rendszer komplex funkcionális neuroanatómiai leírását gastropodákban. Immunhisztokémiai úton a felnőtt *Lymnaea*-ban

kimutattuk, hogy i) a központi idegrendszerben mintegy 45-50, döntően a cerebrális, pedális és pofa (bukkális) ganglionban lokalizálódó GLU-IR neuron fordul elő; ii) a ganglionok neuropilje, az interganglionáris commissurák és connectivumok, továbbá a perifériás idegek gazdagon innerváltak; iii) a talp, tapogató és az ajak számos GLU-IR érzősejtet tartalmaz, míg a talpban és a pofaizomzatban jelölt efferens elemek is előfordulnak. Az egyedfejlődés során kimutattuk, hogy i) Az embriogenezis során E75%-os fejlettségnél megjelennek az első perifériás GLU-IR axonkötegek. E90% stádiumban a ganglionok teljes és a talp és pofaizomzat kezdeti GLU-IR efferens innervációja figyelhető meg. A GLU-IR érzőelemek első képviselői ugyanekkor a talp caudalis régiójában jelennek meg. ii) A korai juvenilis korban (P1-2) a GLUerg rendszer fejlődésére a perifériás érzőrendszer kialakulása a jellemző. iii) P3-4 juvenilis korban a GLU-IR rendszer központi és perifériás elrendeződése megfelel a felnőtt korban megfigyeltnek. P1 és P4 juvenilis szakaszok között a jelölt GLU-IR sejtek száma fokozatosan növekszik. P1-2 korban csak a pedális ganglionban fordulnak elő jelölt neuronok, míg P4 korban azok lokalizációja, de nem száma, már a felnőttkori eloszlást mutatja.

A felnőtt *Lymnaea* KIR-ben (E. Ito és munkatársaival együttműködésben, Tokushima Bunri University) a glutamát transzportereket biokémiai és molekuláris biológiai úton jellemeztük. i) A GLU felvételt és felszabadulást, mely az GluT jelenlétének bizonyítékának tekinthető, biokémiai módon jellemeztük a felnőtt *Lymnaea* központi idegrendszerében. Kimutattuk, hogy a ^3H -GLU felvételét egy egykomponensű, specifikus farmakonokkal blokkolható rendszer jellemzi, melynek mértéke az egyes ganglionokban előforduló GLU-IR neuronok számával korrelál. A felvett ^3H -GLU felszabadulása magas K-tartalmú, illetve magas K- és alacsony Ca-tartalmú médiumban kimutatható volt. Sikeresen klónoztuk a *Lymnaea* agyból a glutamát transzporterek két típusát, a serkentő aminosav transzportert (EAAT) és a vezikuláris glutamát transzportert (VGluT) és megállapítottuk, hogy azok funkcionális doménjei jól konzerváltak összehasonlítva az emlős EAAT-val és VGluT-val. *In situ* hibridizációs kísérletekkel mind az EAAT, mind a VGluT mRNS átírást a *Lymnaea* KIR számos idegsejtjéhez köthetően kimutattuk.

Az EXTRACELLULÁRIS MATRIX (ECM) anyagok előfordulását a gastropoda (*Helix* és *Lymnaea*) központi idegrendszerben vizsgálva akridin-narancs és alciankék festéssel igazoltuk, hogy a *Helix* KIR-ben savanyú proteoglikánok jelen vannak, míg *Lymnaea*-ban nem. Saunders-féle differenciálfestési eljárással kimutattuk, hogy a *Helix* KIR-ben előforduló proteoglikán a hialuronsav. Mind *Helix*-ben, mind *Lymnaea*-ban akriflavin-Schiff reakcióval a neuropil gazdag (nem savas) proteoglikán és glikolipid tartalmát igazoltuk. Toluidinkék bázikus tiazin (pH 4.0) fluorometakromáziás festést mutatott *Helix* és *Lymnaea* mind gliasejtekben, mind neuronokban. A *Lymnaea* embriogenezise során kimutattuk, hogy az akriflavin-Schiff reakció terméke a ganglionok neuropiljében csak nyomokban van jelen késői embrionális és a P1/2 juvenilis stádiumokban, míg a toluidinkék fluorometakromatikus jele kikelésig csak a neuropilben mutatható ki. Mindez az ECM rendszer lassú érése utal.

Különböző, fluoreszcens festékekkel konjugált lektinek alkalmazásával *Lymnaea* és *Helix* KIR-ben kimutattunk α -helyzetben kötött mannózt az ideg- és gliasejt perikaryonok membránjai mentén és a neuropilben, a szílsavval fedett N-acetil-galaktózamint a periganglionáris kötőszövetben. A DSL, LEL STL WGA lektinekkel különböző N-acetil-glükózamin oligomereket azonosító proteoglikánok eltérő elemekhez (glia és/vagy neuron), illetve a neuronok eltérő anatómiai szakaszaihoz kapcsolódnak. A felnőtt *Lymnaea* és *Helix* KIR ECM-jében kimutatott jelentős különbségek az eltérő (szárazföldi illetve vízi) élőhellyel és életmóddal magyarázhatók. A *Lymnaea* egyedfejlődése során az ECM lektin-kötéssel kísért maturációja a következő volt: E35% - a periganglionális kötőszövet megjelenése; E45% -

halvány jel a ganglionokban; E55-E90% - perikaryonális és a neuropiláris jelölődés; P1/2 - szálas struktúra a neuronális perikaryonok körül és a neuropilben. A folyamatot ugyanakkor a különböző lektin molekulák (LEL, STL, WGA) eltérő tér és időbeli megjelenése illetve elrendeződése jellemezte. A különböző helyzetű és számú N-acetil-glükózaminokat tartalmazó proteoglikánok megjelenése során a neuropil tranziensen jelölődik DSL lektinnel E45%-P1/2 korban, LEL lektinnel P1/2-ben, STL lektinnel E55-90% között, míg WGA lektinnel folyamatosan erősödik E45%-tól. Kimutattuk, hogy 14 lektin próbából csak a földimogyoró lektin (PNA; specifikus sejtfelszíni glikoproteinek, glikolipidek és gangliozidok kimutatása) jelöl neuronális struktúrákat. Ezek felnőtt állatban: a) a perifériáról induló érző rostok és azok KIR-beli vetületei; b) a neuropil varikózus elemei és egyes idegsejtek körül a perikaryonális kosár-struktúrák; c) a cerebrális ganglionokban egy-egy szimmetrikusan lokalizálódó neuron csoport. Fejlődő állatban: a) PNA-t kötő perifériás érző rostok és KIR-beli vetületeik a metamorfózis után E60% embriókban jelennek meg, majd korai (P1) posztembrionális korban a PNA tranziensen jelöl idegi perikaryonokat; b) a szem érzékhámja E70% és P3 stádiumok között szintén tranziensen köti a PNA-t.

Az extracelluláris mátrix (ECM) további kutatása során a gastropoda idegrendszerben az ECM nagy tömegét képező glikozilált fehérjéket SDS-PAGE és blottolás útján azonosítottuk *Helix pomatia* felnőtt, valamint *Lymnaea stagnalis* felnőtt és fejlődő (juvenilis, embrionális) idegrendszerből készített homogenizátumokban. Megállapítottuk, hogy a közepesen és erősen savas karakterrel jellemezhető karboxil-, illetve szulfát-csoportokat hordozó szénhidrátok csak kevés, speciális fehérjét glikozilálnak, melyek megoszlása az idegrendszer idegi elemeiben és a külső kötőszövetes burokokban jól elkülöníthető mindkét faj KIR-ében. Lektin-kötődéssel vizsgált mintánként elemezve kimutattuk, hogy a periganglionális burok és az interperikaryonális tér legfőbb alkotója mind *Lymnaea*-ban, mind *Helix*-ben lényegében öt (70, 90, 100, 120, 200 kDa mt) N-acetyl-glükózamin (GlcNAc) oligomer láncokat hordozó glikoprotein. Mind a juvenilis, mind a felnőtt *Lymnaea* KIR-ben kimutattuk egyes glikozilált fehérjék tranziens expresszióját, illetve glikozilációját. Az eredményeink arra utalnak, hogy a gastropoda idegrendszerben a karboxil-csoportokban gazdag glikoproteinek előfordulása jellemző, ellentétben a gerinceseknél tapasztalt kiegyensúlyozottabb, illetve sokkal alacsonyabb GlcNAc/GalNAc aránytól.